

DOI 10.29254/2077-4214-2023-4-171-307-315

UDC 579.22+577.15

Semenenko I. V., Lukianenko D. R., Zubareva I. M., Sklyar T. V.

INTENSIFICATION OF BIOSYNTHETIC ACTIVITY OF STREPTOMYCES SP. 31

Oles Honchar Dnipro National University (Dnipro, Ukraine)

microviro@ukr.net

This work focuses on the necessity and possibility of increasing the biosynthetic activity of the streptomycete strain Streptomyces sp. 31, which is obtained from ordinary chernozem soils. The need to study this strain is explained by the fact that it is considered as a potential producer of biologically active substances – stimulators of metabolic processes in living organisms. This strain has proven antagonistic properties against phytopathogenic bacteria and fungi. However, an urgent issue is the study of its biosynthetic properties in relation to the complex of lytic enzymes, which are inducers of a positive effect on the cells of plants, animals, edible mushrooms, etc. Therefore, it is proposed to intensify the development of the Streptomyces sp strain 31.

The biosynthetic activity of microorganisms depends on the composition of the nutrient medium. Therefore, it is proposed to study the influence of tryptophan, threonine, arginine and glutamic acid as stimulators of biomass growth, activity of staphylolytic enzymes and the intensity of protein synthesis by the studied strain. According to the specified parameters, the control of the results of the experiments was carried out. It was established that threonine at a concentration of 100 µg/ml increased protein yield by 43% compared to the control. Glutamic acid at a concentration of 200 µg/ml had the most significant effect on biomass growth, increasing the amount of biomass by 86% relative to the control. A similar effect was observed in the presence of threonine (on average, by 27.5%) and arginine (by 85%). All four amino acids had a positive effect on the activity of staphylolytic enzymes, arginine at a concentration of 50 µg/ml had the greatest effect, increasing the activity of staphylolyns by 58%.

Key words: streptomycetes, amino acids, lytic activity, fermentation, inducers.

Connection of the publication with planned research works.

This work is a fragment of the SRW: "Biological bases of the functioning of microbiocenosis of the environment and the human body" (state registration number – 0119U100097).

Introduction.

One of the main tasks of biotechnology is the constant search for ways to increase the efficiency of one or another production process. This is achieved in various ways: by increasing the rate of biomass accumulation of the producer microorganism, by intensifying the synthesis of the target metabolite (product), by reducing the number of necessary resources, optimizing production energy consumption, etc. [1]. To achieve this goal, scientists are constantly looking for and researching external and internal influencing factors, which for a particular producer, will have induction effects, that is, will, in one way or another, accelerate or change the metabolic processes of the biological object itself.

Using stimulants of chemical origin is only sometimes acceptable for biotechnological industrial processes, especially in producing biological preparations for medical and food purposes.

However, it is known that microorganisms are potential producers of biologically active substances – stimulators of metabolic processes in living organisms. The successful use of stimulators of microbial origin in plant breeding, animal breeding, beekeeping, and fish farming has been established [2-4].

Microorganisms of the genus Streptomyces are one of the producers of such influence inducers. Streptomycetes are producers of group B vitamins, gibberellins, immunomodulators, antibiotics, etc. [1].

Therefore, it is necessary to search for inducer drugs to accelerate the development of streptomycetes themselves, to obtain in the future, with their help, a more significant number of biologically active substances.

The range of inducers used, or can theoretically be used in the biotechnology of streptomycetes, is wide enough. These include physical factors, inorganic and organic chemicals, and biosynthesis products like antibiotics.

It is known that the use of perfluoroorganic substances with a gas transport function as stimulators of the development of various types of streptomycetes is currently promising [5]. Thus, the introduction of perfluorodecalin into the cultivation medium of *Streptomyces albus* 327-A and *Streptomyces rimosus* K514 led to an acceleration of growth, an increase in biomass and an increase in the antibacterial activity of the culture medium. The maximum concentrations of biomass in the medium with perfluorodecalin, obtained at the 144th hour of growth, exceeded the maximum accumulation of biomass in control at the 192nd hour by 2.1-2.5 times [5].

Different complexes of inorganic substances, particularly metal ions, also stimulate. The most significant trace elements are already actively used in biotechnology to obtain some antibiotics using actinomycetes (iron), some myxomycetes (zinc), etc. [6]. In spore-forming bacteria, microelements activate the processes of carbohydrate metabolism, being part of the corresponding enzymes and helping to esterify the carbohydrate chain of polysaccharides [7].

An example of stimulants of a biological nature are antibiotics in specific concentrations. They affect growth processes and biomass accumulation and activate certain physiological functions. Thus, penicillin in doses of

1-5 µg/ml had a very different effect on the development of streptomycin producer *Streptomyces griseus* depending on the age of the culture. In the early periods of this type of streptomycete growth, the antibiotic inhibited and stimulated the synthesis of streptomycin in the late periods [8].

Addition of different concentrations of grisin to nutrient media with *Streptomyces griseus* stabilized cultures based on morphological features. The presence of grisin also affects the survival of spores: low co-concentrations (1-10 µg/ml) stimulated spore germination, and higher concentrations inhibited it [9].

The composition of the nutrient medium, including its component as a source of nitrogen, has an essential influence on the biosynthetic activity of microorganisms. Some well-known works show positive data on the effect of several amino acids on the relevant physiological characteristics of *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 [10].

However, the effect of organic or inorganic forms of nitrogen as inducers of biosynthesis and growth is highly individual for each microorganism and must be determined empirically. That is why it is relevant to study the effect of amino acids on the metabolism of *Streptomyces* sp. 31.

The aim of the study.

Determination of the influence of some amino acids on the biosynthetic activity of *Streptomyces* sp. 31.

Object and research methods.

The object of the study was the strain *Streptomyces* sp. 31, obtained from ordinary chernozem soils. This strain is antagonistic to phytopathogenic bacteria and fungi and is used in collecting microorganism cultures of the Department of Microbiology, Virology and Biotechnology of DNU [11, 12]. Therefore, the strain needs further study and is chosen as the research object in this work. The spore culture was maintained at 28°C for 12 days on Gauze 1 agar medium with the following composition (g/l): starch (soluble) – 20.0; K₂HPO₄ – 0.5; MgSO₄ – 0.5; KNO₃ – 1.0; NaCl – 0.5; FeSO₄ – 0.01; agar-agar – 20; pH=7.2-7.4.

To obtain vegetative inoculum, the streptomycete spore culture was sown in a block measuring 1 cm×1 cm and grown for two days at 28°C under conditions of deep cultivation (220 rpm) on the medium of the following composition (g/l): soy flour – 4.75; starch – 30.0; NH₄NO₃ – 0.75; K₂HPO₄ – 0.1; CaCO₃ – 2.0; CaCl₂ – 1.0; pH=7.8-8.0.

Vegetative culture in the amount of 5% of the volume was sown in a specially developed fermentation medium (FM-3), which had the following composi-

tion (%): soy flour – 0.6; NH₄NO₃ – 0.15; glucose – 1.1; K₂HPO₄ – 0.027; CaCO₃ – 0.42; CaCl₂ – 0.2; FeSO₄ – 0.005; MnCl₂ – 0.0015; MgCl₂ – 0.056; ZnSO₄ – 0.2•10⁻⁴; pH=8.0.

Fermentation was carried out at 28°C under conditions of deep cultivation (220 rpm) for 72 hours. Samples were taken every 12 hours and analyzed regarding accumulation of cell biomass, the activity of staphylolytic enzymes, the activity of lipase enzymes, and protein synthesis.

When studying the influence of precursors of protein synthesis (amino acids) on growth indicators of the producer, 1 amino acid was used in concentrations of 50, 100 and 200 µg/ml, which were added to the FM-3 fermentation medium after sterilization. In the experiments, amino acids from the "Reachim" company were used – DL-tryptophan, DL-threonine, L-glutamic acid, L-arginine.

The biomass producer's accumulation was expressed in mg of raw mass in 1 ml of nutrient medium. The culture liquid with producer cells was centrifuged in a laboratory centrifuge at 7000 rpm for 15 minutes. The weighing of biomass was carried out using analytical scales.

Determination of the amount of protein was carried out according to the Bradford method [13]. The culture liquid with cells was centrifuged to separate them from the liquid phase at 7000 rpm for 15 min on an OPN-8 laboratory centrifuge. A 20% suspension of these cells was prepared in a physiological solution and treated with ultrasound 6 times for 30 seconds using an ultrasonic disperser-A device, and the destroyed cells were centrifuged at 15,000 rpm for 50 minutes. Determination of proteins was carried out in the supernatant.

The turbidimetric method determined lytic activity in the culture liquid according to the Isono method [14]. The reaction mixture containing 1 ml of culture liquid and 1 ml of test culture cell suspension (the optical density of the reaction mixture at a wavelength of 590 nm and a light path length of 0.5 cm was 0.5-0.6) was incubated for 30 minutes at 55°C. A unit of lytic activity was taken to be the amount of enzyme that reduced the optical density of the suspension by 0.001 in one minute when diluting the enzyme, which is capable of hydrolyzing 25-30% of cells. Washed living cells of *Staphylococcus aureus* 209 P grown on meat-peptone agar for 18 hours were used as a substrate for bacteriolytic enzymes.

Lipase activity was determined according to the Rapp method [15]. The specific activity of lipase was expressed in micromoles of oleic acid, which is released in 1 hour during the hydrolysis of 1 ml of culture liquid.

Experiments were carried out in 3 times. Mathematical processing of the results was carried out using the Microsoft Excel computer program using methods of mathematical statistics [16].

Research results and their discussion.

During the experiments, such amino acids as: tryptophan, threonine, glutamic acid and arginine were added to the nutrient medium in concentrations of 50, 100 and 200 µg/ml, according to previ-

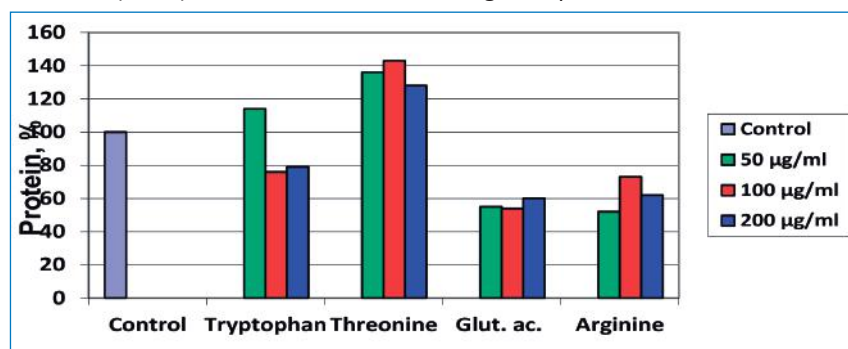


Figure 1 – The effect of the studied amino acids on protein biosynthesis by *Streptomyces* sp. 31.

ous studies. It was found that the studied amino acids had different effects on the level of protein synthesis in streptomycetes. The obtained results are presented graphically (fig. 1).

As can be seen from the diagram, protein synthesis in the presence of threonine increased when it was added in all three concentrations, although the maximum value – 143% of the control was observed at 100 µg/ml. The minimum and maximum concentrations indicators were 136% and 128%, respectively. Thus, the threonine concentration of 100 µg/ml was optimal and caused the *Streptomyces sp. 31* maximum protein synthesis.

In the presence of tryptophan, the protein concentration increased at 50 µg/ml of this amino acid and amounted to 114%, while the protein content at a higher concentration (100 µg/ml and 200 µg/ml) of the studied amino acid was less than 100% (76 and 79%).

Glutamic acid and arginine did not cause an increase in protein synthesis at all in any of the cases of their addition at any concentration. Protein synthesis rates were significantly lower than the control.

Thus, according to the results of this experiment, it was shown that not all amino acids induce protein biosynthesis in streptomycetes. Of these four amino acids, threonine and partially tryptophan have this ability, but glutamic acid and arginine, on the contrary, inhibit protein biosynthesis.

The work also tested the effect of the indicated amino acids on biomass accumulation by the studied strain, shown in figure 2.

The diagram shows that the presence of threonine at concentrations of 100 and 200 µg/ml increased the biomass yield of the strain by 24 and 31%, respectively, relative to the control.

The presence of glutamic acid at a concentration of 200 µg/ml increased the biomass accumulation of the strain to a maximum value of 186%. The addition of lower concentrations did not result in such a significant increase.

Adding 50 µg/ml arginine resulted in an 11% increase in the biomass of streptomycete cells, and 100 µg/ml – by 85% compared to the control.

Tryptophan did not cause an increase in producer biomass at all.

To establish the influence of the corresponding amino acids on the synthesis of staphylolytic enzymes of the studied strain, the necessary experiments and calculations presented in figure 3 were carried out.

The obtained graphical data show that under the influence of all exogenously applied amino acids, there was an increase in the activity of staphylolyns from 5% to 58%. A clear

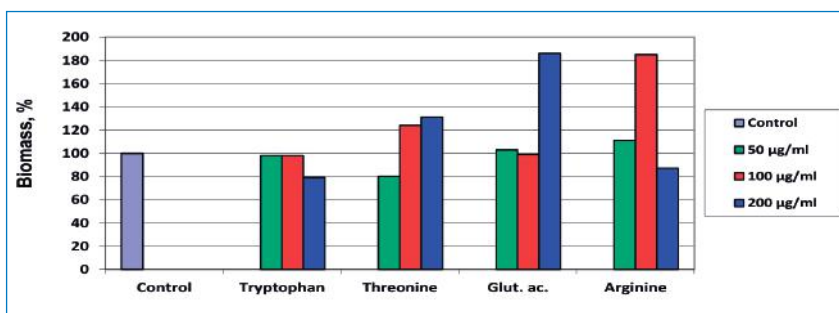


Figure 2 – Biomass accumulation by *S. sp. 31* in the presence of different amino acids.

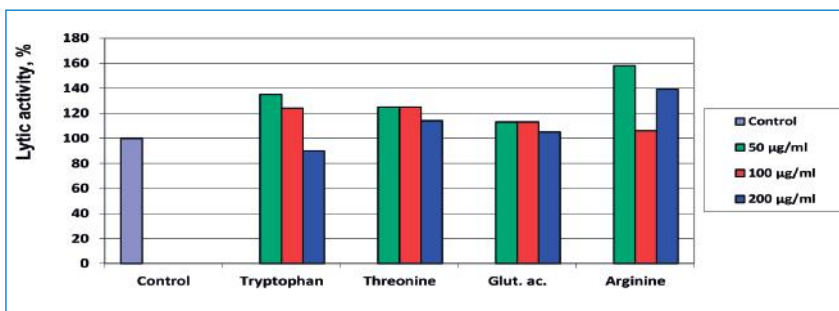


Figure 3 – Synthesis of staphylolytic enzymes by *S. sp. 31* in the presence of different amino acids.

pattern of decreasing activity with increasing concentration of amino acids was observed; only the maximum concentration of tryptophan (200 µg/ml) did not contribute to the synthesis of streptolysins above the control indicators and was even lower – 90%. The maximum activity rate of staphylolytic enzymes (158%) was found in the presence of arginine (50 µg/ml).

Therefore, it was found that protein synthesis was actively increased by 43% with exogenous introduction of threonine (100 µg/ml), moderately by 14% of tryptophan (50 µg/ml); Threonine (100 and 200 µg/ml) also actively, but not maximally increased the yield of streptomycete biomass by 24-31%; more intensively (by 85-86%) – glutamic acid and arginine, respectively; the activity of staphylolyns increased by 58% – with arginine, moderately by 14-35% – with glutamic acid, threonine, tryptophan.

Thus, a direct correlation of the increase in protein synthesis and biomass was observed when using only one amino acid – threonine in 100 and 200 µg/ml concentrations. This is probably explained by the ease of assimilation of threonine by producer cells compared to other amino acids due to its lower molecular weight.

Since stable positive data on the biosynthetic characteristics of the strain *Streptomyces sp. 31* in the presence of threonine, the possibility of replacing NH_4NO_3 with threonine at a concentration of 100 µg/ml in the fermentation medium was investigated, which is presented in the table.

Table – Biosynthetic characteristics of the strain *Streptomyces sp. 31* when replacing the nitrogen source NH_4NO_3 with threonine

Research option	Protein		Biomass		Lytic activity	
	mg/ml	K ¹ , %	mg/ml	K, %	units/ml	K, %
Control without amino acid	0,39	100	8,3±0,05	100	1987±50,73	100
Replacement of the nitrogen supply source	0,087	22	7,54±0,01	91	976±21,89	49

Note: ¹)Control.

As seen from the **table**, the replacement contributed to a very low level of protein synthesis. In the presence of threonine without NH_4NO_3 , the level of protein synthesis was only 22% of the control. The accumulation of streptomycete biomass was 91%, and the activity of enzymes that lyse staphylococcal cells was reduced by almost 2 times. Such a low level of protein synthesis, enzymes, and biomass accumulation is likely explained by the fact that the most optimal form of nitrogen nutrition for streptomycetes is inorganic under the conditions of this experiment. Thus, replacement of NH_4NO_3 ions by threonine was insufficient.

Conclusions.

Based on the results of all the above experiments, it can be concluded that not all amino acids can be represented as inducers of the biosynthetic activity of *Streptomyces* sp. 31.

Streptomyces sp. 31. It is also worth noting that different amino acids induced various aspects of the biosynthetic activity. With the help of diagrams, the inverse dependence of the increase in induction by amino acids with an increase in their concentration was shown. Replacing the amino acid with threonine NH_4NO_3 in the fermentation medium did not induce but significantly reduced all parameters.

Prospects for further research.

It is advisable to continue research on the intensification of the development and biosynthetic activity of *Streptomyces* sp. 31. It is necessary to study the influence of lipids (vegetable oils) on the physiological activity of the studied streptomycete strain as an additional and sole source of carbon nutrition.

DOI 10.29254/2077-4214-2023-4-171-307-315

УДК 579.22+577.15

Семененко І. В., Лук'яненко Д. Р., Зубарева І. М., Скляр Т. В.

ІНТЕНСИФІКАЦІЯ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ STREPTOMYCES SP. 31

Дніпровський національний університет ім. Олеся Гончара (м. Дніпро, Україна)

microviro@ukr.net

В даній роботі вивчена необхідність і можливість підвищення біосинтетичної активності штама стрептоміцети *Streptomyces* sp. 31, який отриманий зі звичайних чорноземних ґрунтів. Необхідність дослідження даного штама пояснюється тим, що він розглядається як потенційний продуцент біологічно активних речовин – стимуляторів метаболічних процесів у живих організмів. У даного штама підтверджені антагоністичні властивості до фітопатогенних бактерій та грибів. Але, актуальним питанням є вивчення його біосинтетичних властивостей щодо комплексу літичних ферментів, які є індукторами позитивного впливу на клітини рослин, тварин, їстівних грибів тощо. Тому і пропонується інтенсифікувати розвиток самого штама *Streptomyces* sp. 31.

Біосинтетична активність мікроорганізмів залежить від складу поживного середовища. Тому запропоновано вивчити вплив триптофану, треоніну, аргініну та глутамінової кислоти в якості стимуляторів росту біомаси, активності стафілолітичних ферментів та інтенсивності синтезу білка досліджуваным штамом. За вказаними параметрами проводили і контроль результатів дослідів. Встановлено, що треонін у концентрації 100 мкг/мл збільшив вихід білка на 43% у порівнянні з контролем. На приріст біомаси найбільше вплинула глутамінова кислота у концентрації 200 мкг/мл, збільшивши кількість біомаси на 86% відносно контролю. Аналогічний ефект спостерігали у присутності треоніну (в середньому на 27,5%) та аргініну (на 85%). На активність стафілолітичних ферментів позитивно впливали всі чотири амінокислоти, найбільший вплив мав аргінін у концентрації 50 мкг/мл, збільшивши активність стафілолізину на 58%.

Ключові слова: стрептоміцети, амінокислоти, літичні ферменти, біосинтетична активність, ферментація, індуктори.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дана робота є фрагментом НДР: «Біологічні основи функціонування мікробіоценозів навколишнього середовища та організму людини» (державний реєстраційний номер – 0119U100097).

Вступ.

Одним з головних завдань біотехнології є постійний пошук шляхів для підвищення ефективності того чи іншого виробничого процесу. Це досягається різними способами: підвищенням швидкості накопичення біомаси мікроорганізма-продуцента, інтенсифікацією синтезу цільового метаболіту (продукту); зменшенням кількості необхідних ресурсів, оптимізацією виробничих енерговитрат тощо [1]. Задля досягнення цієї мети науковці постійно шукають та досліджують зовнішні та внутрішні фактори впливу,

які для певного продуцента будуть мати індукційний ефект, тобто будуть тим чи іншим шляхом прискорювати або змінювати метаболічні процеси самого біологічного об'єкта.

Використання стимуляторів хімічного походження не завжди є прийнятним для біотехнологічних промислових процесів, особливо на виробництвах біопрепаратів медичного та харчового призначення.

Але, відомо, що потенційними продуцентами біологічно активних речовин – стимуляторів метаболічних процесів у живих організмів є мікроорганізми. Встановлено успішне використання стимуляторів мікробного походження в рослинництві, тваринництві, бджільництві, рибництві [2-4].

Одними з продуцентів таких індукторів впливу є мікроорганізми роду *Streptomyces*. Стрептоміцети є

продуцентами вітамінів групи В, гіберелінів, імуномодуляторів, антибіотиків тощо [1].

Тому необхідно вести пошук препаратів-індукторів для прискорення розвитку самих стрептоміцетів, з метою отримання у перспективі за їх допомогою більшої кількості біологічно-активних речовин.

Спектр індукторів, що використовуються, або можуть теоретично використовуватися у біотехнології стрептоміцетів, достатньо широкий. Це можуть бути фізичні фактори, різні неорганічні та органічні хімічні речовини, а також продукти біосинтезу, такі як антибіотики.

Відомо, що перспективним на сьогоднішній час є використання перфторорганічних речовин з газо-транспортною функцією в якості стимуляторів розвитку різних видів стрептоміцетів [5]. Так, внесення перфтордекаліну в середовище культивування *Streptomyces albus* 327-A та *Streptomyces rimosus* K514 призвело до прискорення росту, збільшення біомаси і росту антибактеріальної активності культурального середовища. Максимальні концентрації біомаси в середовищі з перфтордекаліном, що були отримані на 144-й годині росту, перевищували максимуми накопичення біомаси в контролі на 192-й годині у 2,1-2,5 разів [5].

Стимулюючи дію проявляють і різні комплекси неорганічних речовин, зокрема іони металів. Найбільш значущі мікроелементи вже активно використовуються у біотехнології отримання деяких антибіотиків з використанням актиноміцетів (залізо), деяких міксоміцетів (цинк), тощо [6]. У спороутворюючих бактерій мікроелементи активують процеси вуглеводного обміну, входячи у склад відповідних ферментів та допомагаючи етерифікації вуглеводного ланцюга полісахаридів [7].

Прикладом стимуляторів біологічної природи є антибіотики у певних концентраціях. Вони впливають на ростові процеси, накопичення біомаси та активують окремі фізіологічні функції. Так, пеніцилін у дозах 1-5 мкг/мл мав дуже різний вплив на розвиток продуцента стрептоміцину *Streptomyces griseus* в залежності від віку культури. В ранні строки росту даного виду стрептоміцету антибіотик пригнічував, а в пізні строки – стимулював синтез стрептоміцину [8].

Додавання різних концентрацій гризину в поживні середовища з *Streptomyces griseus* стабілізувало культури за морфологічними ознаками. Присутність гризину впливає і на виживання спор: низькі коефіцієнти (1-10 мкг/мл) стимулювали проростання спор, а більш високі – пригнічували [9].

Важливий вплив на біосинтетичну активність мікроорганізмів має склад поживного середовища, в тому числі і такий його компонент як джерело азоту. Відомі роботи, в яких показані позитивні дані впливу ряду амінокислот на відповідні фізіологічні характеристики *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2P-15 [10].

Але, вплив органічних або неорганічних форм азоту як індукторів біосинтезу та росту є вкрай індивідуальним для кожного мікроорганізму і повинен визначатися емпіричним шляхом. Саме тому актуальним є проведення дослідження впливу амінокислот на метаболізм *Streptomyces* sp. 31.

Мета дослідження.

Визначення впливу деяких амінокислот на біосинтетичну активність штаму *Streptomyces* sp. 31.

Об'єкт і методи дослідження.

Об'єктом дослідження був штам *Streptomyces* sp. 31, отриманий зі звичайних чорноземних ґрунтів. Цей штам є антагоністом до фітопатогенних бактерій та грибів і знаходиться в колекції культур мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ДНУ [11, 12]. Штам потребує подальшого вивчення і тому обраний як об'єкт досліджень в даній роботі. Спорову культуру підтримували при 28°C протягом 12 діб на агаризованому середовищі Гаузе 1 наступного складу (г/л): крохмаль (розчинний) – 20,0; K_2HPO_4 – 0,5; $MgSO_4$ – 0,5; KNO_3 – 1,0; NaCl – 0,5; $FeSO_4$ – 0,01; агар-агар – 20; pH=7,2-7,4.

Для отримання вегетативного посівного матеріалу спорову культуру стрептоміцета засівали блоком розміром 1смх1см і вирощували дві доби при 28°C в умовах глибинного культивування (220 об/хв) на посівному середовищі наступного складу (г/л): соєве борошно – 4,75; крохмаль – 30,0; NH_4NO_3 – 0,75; K_2HPO_4 – 0,1; $CaCO_3$ – 2,0; $CaCl_2$ – 1,0; pH=7,8-8,0.

Вегетативну культуру у кількості 5% від об'єму засівали у спеціально розроблене ферментаційне середовище (ФС-3), яке мало наступний склад (%): соєве борошно – 0,6; NH_4NO_3 – 0,15; глюкоза – 1,1; K_2HPO_4 – 0,027; $CaCO_3$ – 0,42; $CaCl_2$ – 0,2; $FeSO_4$ – 0,005; $MnCl_2$ – 0,0015; $MgCl_2$ – 0,056; $ZnSO_4$ – $0,2 \cdot 10^{-4}$; pH=8,0.

Ферментацію проводили при 28°C в умовах глибинного культивування (220 хв/об) протягом 72 годин. Проби відбирали кожні 12 годин та аналізували відносно: накопичення біомаси клітин, активності стафілолітичних ферментів, активності ферментів ліпаз, синтезу білків.

При дослідженні впливу попередників синтезу білка (амінокислот) на ростові показники продуцента, використовували по 1 амінокислоті у концентраціях 50, 100 та 200 мкг/мл, які додавали до ферментаційного середовища ФС-3 після стерилізації. У дослідях використовували амінокислоти фірми «Рехаім» – DL-триптофан, DL-треонін, L-глутамінова кислота, L-аргінін.

Величину накопичення продуцентом біомаси вимірювали в мг сирої маси в 1 мл живильного середовища. Культуральну рідину з клітинами продуцента центрифугували на лабораторній центрифугі при 7000 об/хв протягом 15 хв. Зважування біомаси проводили за допомогою аналітичних вагів.

Визначення кількості білка проводили за методом Бредфорда [13]. Культуральну рідину з клітинами центрифугували для їх відділення від рідкої фази при 7000 об/хв протягом 15 хв на лабораторній центрифугі ОПМ-8. Готували 20% суспензію цих клітин у фізіологічному розчині і проводили її обробку ультразвуком 6 разів по 30 с на приладі УЗДН-А та центрифугували зруйновані клітини при 15000 об/хв протягом 50 хв. Визначення білків проводили в супернатанті.

Літичну активність в культуральній рідині визначали турбідиметричним способом за методом Ісопо [14]. Реакційну суміш, щомістила 1 мл культуральної рідини та 1 мл суспензії клітин тест-культури (оптична густина реакційної суміші при довжині хвилі 590 нм та довжині світлового шляху 0,5 см складала 0,5-0,6), інкубували протягом 30 хвилин при 55°C. За одиницю літичної активності приймали таку кількість ферменту, яка знижувала оптичну густину суспензії

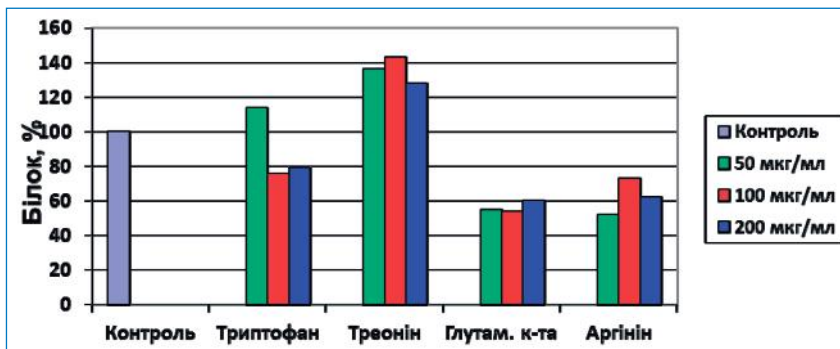


Рисунок 1 – Вплив досліджуваних амінокислот на біосинтез білка штамом *Streptomyces sp. 31*.

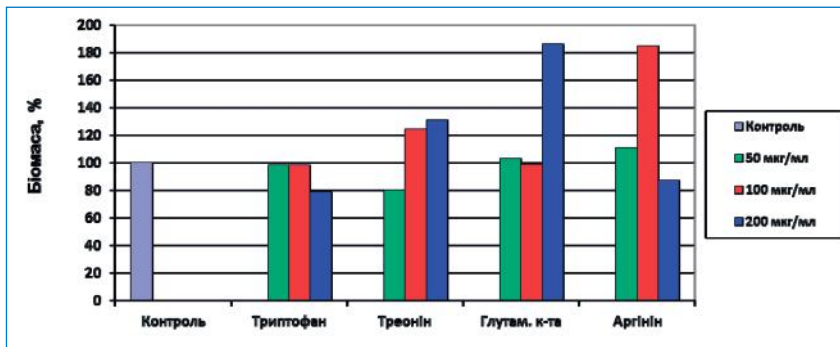


Рисунок 2 – Накопичення біомаси штамом *S. sp. 31* у присутності різних амінокислот.

на 0,001 за одну хвилину при розведенні ферменту, яке здатне гідролізувати 25-30% клітин. В якості субстрату бактеріолітичних ферментів використовували відмиті живі клітини *Staphylococcus aureus* 209 P, що вирощувалися на м'ясо-пептонному агарі протягом 18 годин.

Визначення ліпазної активності проводили за методом Rapp [15]. Специфічну активність ліпази виражали в мікромолях олеїнової кислоти, що звільняється за 1 годину при гідролізі 1 мл культуральної рідини.

Досліди проводили у 3-х кратній повторності. Математичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel з використанням методів математичної статистики [16].

Результати дослідження та їх обговорення.

В ході проведення експериментів до поживного середовища додавали такі амінокислоти як: триптофан, треонін, глутамінова кислота та аргінін у концентраціях 50, 100 та 200 мкг/мл, згідно з попередніми дослідженнями. Виявлено, що досліджувані амінокислоти мали різний вплив на рівень синтезу

білка у стрептоміцета. Отримані результати представлені графічно (рис. 1).

Як видно з діаграми, синтез білка у присутності треоніну збільшився при додаванні його у всіх трьох концентраціях, хоча максимального значення – 143% від контролю спостерігалось при 100 мкг/мл. Показники при мінімальній та максимальній концентраціях склали відповідно – 136% і 128%. Таким чином, концентрація треоніну 100 мкг/мл була найоптимальнішою і викликала у штаму *Streptomyces sp. 31* максимальний синтез білка.

У присутності триптофану концентрація білка збільшилась при 50 мкг/мл цієї амінокислоти і склала 114% в той час як показники вмісту білка при вищій концентрації (100 мкг/мл та 200 мкг/мл) досліджуваної амінокислоти були менші ніж 100% (76 та 79%).

Глутамінова кислота та аргінін зовсім не викликали підвищення синтезу білка ні в одному з випадків їх додавання у будь-якій концентрації. Показники синтезу білка були суттєво нижчі за контроль.

Таким чином, за результатами цього досліду було показано, що не всі амінокислоти індукують біосинтез білка у стрептоміцета. З даних чотирьох амінокислот такою здатністю володіє треонін і частково триптофан, а ось глутамінова кислота і аргінін навіть навпаки – інгібують біосинтез білка.

В роботі також була перевірена дія вказаних амінокислот на накопичення біомаси досліджуваним штамом, що показано на **рисунку 2**.

З діаграми видно, що присутність треоніну у концентраціях 100 та 200 мкг/мл збільшила вихід біомаси штаму на 24 та 31% відповідно відносно контролю.

Присутність глутамінової кислоти у концентрації 200 мкг/мл збільшила накопичення біомаси штаму до максимального значення 186%. Додавання менших концентрацій не призвело до такого суттєвого підвищення.

Додавання 50 мкг/мл аргініну призвело до збільшення біомаси клітин стрептоміцету на 11%, а 100 мкг/мл – на 85% у порівнянні з контролем.

Триптофан зовсім не викликав підвищення кількості біомаси продуцента.

Задля встановлення впливу відповідних амінокислот на синтез стафілолітичних ферментів досліджуваного штаму були проведені необхідні досліді та розрахунки, що представлені на **рисунку 3**.

Отримані графічні дані свідчать, що під впливом всіх екзогенно внесених амінокислот

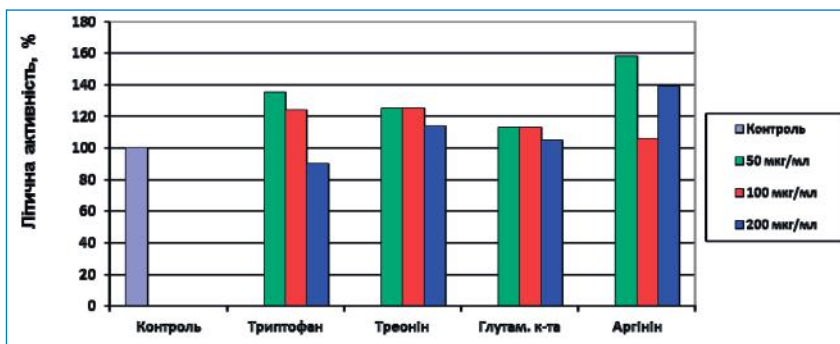


Рисунок 3 – Синтез стафілолітичних ферментів штамом *S. sp. 31* у присутності різних амінокислот.

виникло підвищення активності стафілолізину від 5% до 58%. Спостерігалася чітка закономірність зниження активності з підвищенням концентрації амінокислот, лише тільки максимальна концентрація триптофану (200 мкг/мл) не сприяла синтезу стрептолізину вище контрольних показників, а була навіть нижчою – 90%. Максимальний показник активності стафілолітичних ферментів (158%) виявлено у присутності аргініну (50 мкг/мл).

Отже, виявлено, що активно збільшено синтез білка на 43% при екзогенному внесенні треоніну (100 мкг/мл), помірно – на 14% триптофану (50 мкг/мл); активно, але не максимального збільшено вихід біомаси стрептоміцету на 24-31% також треоніном (100 та 200 мкг/мл); більш інтенсивно (на 85-86%) – глутаміновою кислотою та аргініном відповідно; збільшено активність стафілолізину на 58% – аргініном, помірно на 14-35% – глутаміновою кислотою, треоніном, триптофаном.

Таким чином, спостерігалася пряма кореляція збільшення синтезу білка та біомаси при використанні тільки однієї амінокислоти – треоніну у концентраціях 100 та 200 мкг/мл. Це пояснюється, ймовірно, легкістю засвоєння саме треоніну клітинами продуцента порівняно з іншими амінокислотами через її меншу молекулярну масу.

Оскільки було отримано стабільні позитивні дані про біосинтетичні характеристики штаму *Streptomyces sp. 31* у присутності треоніну, було досліджено можливість заміни у ферментаційному середовищі джерела азотного живлення – NH_4NO_3 на треонін у концентрації 100 мкг/мл, що представлено в таблиці.

Як видно з таблиці, заміна сприяла дуже низькому рівню синтезу білка. У присутності треоніну без NH_4NO_3 рівень синтезу білка склав лише 22% до кон-

Таблиця – Біосинтетичні характеристики штаму *Streptomyces sp. 31* при заміні джерела азотного живлення NH_4NO_3 на треонін

Варіант досліджу	Білок		Біомаса		Літична активність	
	мг/мл	К ¹ , %	мг/мл	К, %	од/мл	К, %
Контроль без амінокислоти	0,39	100	8,3±0,05	100	1987±50,73	100
Заміна джерела азотного живлення	0,087	22	7,54±0,01	91	976±21,89	49

Примітка: ¹Контроль.

тролю. Накопичення біомаси стрептоміцетів становило 91%, а активність ферментів, лізуючих клітини стафілокока зменшено майже у 2 рази. Такий низький рівень синтезу білка, ферментів, накопичення біомаси пояснюється, скоріш за все тим, що найбільш оптимальною формою азотного живлення для стрептоміцету є неорганічна в умовах даного експерименту. Таким чином, заміна іонів NH_4NO_3 на треонін була недостатньою.

Висновки.

За результатами усіх проведених вище експериментів можна зробити висновок, що не всі амінокислоти можуть бути представлені в якості індукторів біосинтетичної активності *Streptomyces sp. 31*. Також варто зазначити, що різні амінокислоти індуквали різні аспекти біосинтетичної активності. За допомогою діаграм була показана непрямопропорційна залежність збільшення індукції амінокислотами зі збільшенням їх концентрацій. Заміна амінокислотою треоніном NH_4NO_3 у ферментаційному середовищі не тільки не індуквала, але й суттєво знизила усі показники.

Перспективи подальших досліджень.

Доцільним є продовження досліджень по інтенсифікації розвитку і біосинтетичної активності *Streptomyces sp. 31*. Небхідно вивчити вплив ліпідів (рослинних олій) на фізіологічну активність досліджуваного штаму стрептоміцету в якості додаткового та єдиного джерела вуглецевого живлення.

References / Література

- Valagurova EV, Kozyrtskaya VE, Iutinskaya GA. Aktinomitsyety roda Streptomyces: opysaniye vidov i komp'yuternaya programma ikh identifikatsii. Kyiv: Naukova dumka; 2003. 645 s. [in Ukrainian].
- Alekseenko EN, Zhernosekova IV, Vinnikov AI. Izucheniye vliyaniya kul'turnoy zhidkosti streptomitseta na nakopleniye biomassy Pleurotus ostreatus. Mikrobiologiya ta biotekhnologiya. 2012;5:66-73. [in Ukrainian].
- Basova KO, Korovka KA, Zubareva IM. Vplyv stimulyatoriv streptomitsetnoho pokhodzhennya na rozvytok Pleurotus ostreatus. Mat. Mizhnarodnoi naukovy-praktychnoi internet-konferentsii Tendentsiya i perspektivy rozvytku nauky i osvity v umovakh hlobalizatsiyi; 2019 Lyst 28; Pereyaslav; 2019. s. 5-7. [in Ukrainian].
- Hrytsayenko KO, Vinnykov AI, Zubareva IM. Vykorystannya preparativ streptomitsetnoho pokhodzhennya v vermikul'tyvanni. Tezy dopovidy VII Mizhnarodna naukova konferentsiya studentiv ta aspirantiv Molod' i postup biolohii; 2016 Kviten 19-21; Lviv. Lviv: LNU; 2016. s. 225. [in Ukrainian].
- Bakulin VM, Martinsen E, Bakulin MK, Tykhonov IV. Vplyvnyye perfradekalyna na rost y antybyotycheskuyu aktivnost' kultur Streptomyces albus y S. rimosus v zhydkoy srede. Veterynarnaia medytyna. 2012;3-4:15-17. [in Ukrainian].
- Valahurova OV, Kozyrtska VE, Pindrus AA, Pil'yashenko-Novokhatnyi AI, Azimtseva OO. Vplyv vazhkykh metaliv na rist gruntovykh streptomitsetiv. Mikrobiol. zhurn. 2001;63(3):31-37. [in Ukrainian].
- Osadchaya AI, Kudryavtsev VA, Safronova LA. Vliyanye mikroelementov na nakopleniye biomassy y ekzopolysakharidov shtammamy Bacillus subtilis. Mikrobiol. zhurn. 2000;62(1):20-29. [in Ukrainian].
- Petrova NT, Pavlova NM, Shishkova EA, Larina LN, Bravova HB. Optymyzatsiya byosyntezy lytycheskykh fermentov termotolerantym aktinomitsetom Streptomyces griseus 11-84. Biotechnologiya. 2002;1:28-35.
- Ivanko OV, Varbanets LD. Keratolitychna aktivnist' Streptomyces sp. 1382. Mikrobiol. zhurn. 2004;66(1):3-9. [in Ukrainian].
- Zhernosekova IV, Tymchuk AA, Ponizovtseva AG. Byosyntetycheskye kharakterystyky mutanntnoho shtamma Streptomyces recifensis var. lytycus 2P15 v prysutstviy ekzohenykh aminokyslot. Biosystems Diversity. 2007;15:33- 38. [in Ukrainian].
- Sklyar TV, Dreghval OA, Cherevach NV. Antagonistic activity of microorganisms isolated from chernozem against plant pathogens. Ukrainian Journal of Ecology. 2020;10(1):292-299. [in Ukrainian].
- Yeremenko AO, Dreghval OA, Cherevach NV, Vinnykov AI. Antahonistychna aktivnist' gruntovykh streptomitsetiv po vidnosynu do fitopatohenykh bakteriy ta hrybiv. Mikrobiologiya i biotekhnologiya. 2017;1:73- 84. [in Ukrainian].
- Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. Anal. Biochem. 1976;72:248-254.
- Isono M, Takahashi T, Yamazaki Y, inventors. Bacteriolytic enzyme and process for the production thereof. Patent USA 3649454, C 12 K 1/06.M. 1972 Apr.

15. Rapp P. Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 1995;17:832- 833.
16. Frolova LA, Mel'nykov BI, Halivets' YD, Mitina NB. Matematychnе modelyuvannya ta optymizatsiya ob'yektiv tekhnolohiyi neorhanichnykh rechovyh. Dnipropetrovsk: Zhurfond; 2010. 147 s. [in Ukrainian].

ІНТЕНСИФІКАЦІЯ БІОСИНТЕТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ *STREPTOMYCES* SP. 31

Семененко І. В., Лук'яненко Д. Р., Зубарева І. М., Скляр Т. В.

Резюме. Необхідність використання природних стимулюючих препаратів характерна для сучасного рослинництва, бджільництва, тваринництва, рибиства. Сучасні технології вирощування їстівних грибів, вермікультування також передбачають застосування біологічно-активних речовин-індукторів, які сприяють прискоренню розвитку відповідних організмів-продуцентів.

В якості мікроорганізму – продуцента подібних метаболітів запропоновано вивчити штам *Streptomyces* sp. 31. Але, інтенсифікації розвитку і біосинтетичної активності потребує і сам продуцент речовин-індукторів – досліджуваний штам *Streptomyces* sp. 31.

Мета. Полягає у визначенні впливу джерел азоту (деяких амінокислот) на біосинтетичну активність штаму *Streptomyces* sp. 31.

Відповідно до поставленої мети вирішувались наступні завдання: 1) дослідити вплив додавання у ферментаційне середовище триптофану, треоніну, глутамінової кислоти та аргініну в якості додаткових джерел азотного живлення на біосинтез білка, активність стафілолітичних ферментів та динаміку накопичення біомаси штамом *Streptomyces* sp. 31; 2) дослідити вплив треоніну в ролі єдиного джерела азотного живлення, з виключенням неорганічних форм азоту, зокрема NH_4NO_3 , на відповідні фізіологічні характеристики штаму *Streptomyces* sp. 31.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом дослідження були процеси інтенсифікації біосинтетичної активності штаму *Streptomyces* sp. 31 під впливом різних джерел азоту. В якості речовин-індукторів використовували такі амінокислоти, як триптофан, треонін, глутамінова кислота та аргінін.

Окремо по 1 амінокислоті у концентраціях 50, 100 та 200 мкг/мл додавали до ферментаційного поживного середовища ФС-3 після стерилізації.

Використовували біохімічні, біометричні, мікробіологічні методи.

Результати. Виявлено, що не всі досліджені амінокислоти можуть бути використані в якості індукторів біосинтетичної активності *Streptomyces* sp. 31. Також встановлено, що на різні аспекти біосинтетичної активності стрептоміцети мають вплив різні досліджувані амінокислоти. Спостерігалася пряма кореляція збільшення синтезу білка та біомаси при використанні тільки однієї амінокислоти (серед досліджених) – треоніну у концентраціях 100 та 200 мкг/мл.

Висновок. Використання треоніну в ролі єдиного джерела азоту з виключенням NH_4NO_3 із складу поживного середовища негативно впливає на фізіологічні характеристики штаму *Streptomyces* sp. 31.

Ключові слова: стрептоміцети, амінокислоти, літична активність, ферментація, індуктори.

INTENSIFICATION OF BIOSYNTHETIC ACTIVITY OF *STREPTOMYCES* SP. 31

Semenenko I. V., Lukianenko D. R., Zubareva I. M., Sklyar T. V.

Abstract. The necessity of using natural stimulants is characteristic of modern agriculture, beekeeping, animal husbandry, and fish farming. Modern technologies for growing edible mushrooms and vermiculture also involve the use of biologically active substances-inductors that accelerate the development of respective producer organisms. The strain *Streptomyces* sp. 31 has been proposed as a microorganism-producer of such metabolites. However, the development and biosynthetic activity of the inductor substances themselves require investigation, particularly in the case of the studied strain *Streptomyces* sp. 31.

Objective. The objective is to determine the influence of nitrogen sources (certain amino acids) on the biosynthetic activity of the strain *Streptomyces* sp. 31.

The following tasks were addressed in accordance with the set objective: 1) investigate the effect of adding tryptophan, threonine, glutamic acid, and arginine as additional nitrogen sources on protein biosynthesis, staphylolytic enzyme activity, and biomass accumulation dynamics of the strain *Streptomyces* sp. 31 in the fermentation medium; 2) investigate the effect of threonine as the sole nitrogen source, excluding inorganic forms of nitrogen, specifically NH_4NO_3 , on the relevant physiological characteristics of the strain *Streptomyces* sp. 31.

The object and methods of the study. The object was the processes of intensification of biosynthetic activity of the strain *Streptomyces* sp. 31 under the influence of various nitrogen sources. Amino acids such as tryptophan, threonine, glutamic acid, and arginine were used as inductor substances.

Each amino acid was separately added to the fermentation medium FS-3 after sterilization in concentrations of 50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Biochemical, biometric, and microbiological methods were used.

Results. It was found that not all investigated amino acids can be used as inducers of biosynthetic activity in *Streptomyces* sp. 31. It was also established that different investigated amino acids have an impact on different aspects of the biosynthetic activity of *Streptomyces*, and there was a direct correlation between increased protein and biomass synthesis when using only one amino acid (among those studied) – threonine at concentrations of 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Conclusion. The use of threonine as the sole source of nitrogen, excluding NH_4NO_3 from the nutrient medium, negatively affects the physiological characteristics of the strain *Streptomyces* sp. 31.

Key words: streptomyces, amino acids, lytic activity, fermentation, inductors.

ORCID and contribution / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Semenenko I. V.: <https://orcid.org/0009-0005-5488-2103>^{CD}

Lukianenko D. R.: <https://orcid.org/0009-0002-6269-5891>^{BD}

Zubareva I. M.: <https://orcid.org/0000-0002-8160-6519>^{EF}

Skliar T. V.: <https://orcid.org/0000-0003-0224-2460>^A

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest. / Автори статті підтверджують відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Zubareva Inna Mykhaylivna / Зубарева Інна Михайлівна

Oles Honchar Dnipro National University / Дніпровський національний університет ім. Олеса Гончара
Ukraine, 49000, Dnipro, 9 Naukova str. / Адреса: Україна, 49000, м. Дніпро, вул. Наукова 9

Tel.: +380970346448 / Тел.: +380970346448

E-mail: microviro@ukr.net

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статистичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 17.05.2023 / Стаття надійшла 17.05.2023 року
Accepted 06.11.2023 / Стаття прийнята до друку 06.11.2023 року